点蜂缘蝽触角转录组及化学感受相关基因的分析

宋月芹，董钧锋，陈庆霄，胡振杰，孙会忠*

（河南科技大学林学院，河南洛阳 471000）

摘要：【目的】点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 主要为害豆科作物，成虫和若虫刺吸汁液，造成严重损失，目前对该虫的研究较少，基因信息缺乏。本研究旨在获得点蜂缘蝽的触角转录组数据，开发基于嗅觉防治害虫的新方法。【方法】利用 Illumina HiSeq™ 4000 高通量测序技术测定了点蜂缘蝽成虫触角转录组，并进行了生物学信息分析。【结果】共获得 45 802 812 条 clean reads，包括 6.87 Gb（GenBank 登录号：SRR4429103）。拼接 92 259 条 unigenes，平均长度为 618 bp，N50 为 1 013 bp。在 7 大数据库中注释到 21 365 条 unigenes。通过进一步转录组数据分析，我们鉴定出 219 个点蜂缘蝽化学感受相关基因，包括 188 个嗅觉受体、6 个味觉受体、2 个离子型受体、4 个感觉神经元膜蛋白、8 个气味结合蛋白和 11 个化学感受蛋白。氨基酸序列分析发现，RpedOBP1 和 RpedOBP2 在第 6 个保守的半胱氨酸后又多了 3 个保守的半胱氨酸位点，属于加 Plus-C 气味结合蛋白家族。【结论】本研究获得了点蜂缘蝽触角转录组数据，并鉴定出嗅觉相关基因，结果为今后利用嗅觉基因靶标防治点蜂缘蝽提供了重要的分子生物学信息数据。

关键词：点蜂缘蝽；触角转录组；高通量测序；基因注释；化学感受相关基因

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2017)10-1120-09

Analysis of the antennal transcriptome and chemoreception-related genes of the bean bug, *Riptortus pedestris* (Hemiptera: Alydidae)

SONG Yue-Qin, DONG Jun-Feng, CHEN Qing-Xiao, HU Zhen-Jie, SUN Hui-Zhong* (Forestry College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: 【Aim】*Riptortus pedestris* is a major soybean pest which feeds juice in the stages of adult and nymph, causing serious damage to production. However, *R. pedestris* has been rarely researched, that leads to the lack of genomic resources. The objective of this study is to obtain the antennal transcriptome data of *R. pedestris* and to seek new methods for pest control through olfaction. 【Methods】The adult antennal transcriptome of *R. pedestris* is sequenced using Illumina HiSeq™ 4000 platform and analyzed bioinformatically. 【Results】In total, 45 802 812 clean reads with 6.87 Gb were obtained (GenBank accession no.: SRR4429103). There were 92 259 unigenes with the mean length of 618 bp and an N50 of 1 013 bp. A total of 21 365 unigenes were annotated based on seven databases. By further analyzing the transcriptome data, we identified 219 chemoreception-related genes including 188 for olfactory receptors (ORs), 6 for gustatory receptors (GRs), 2 for ionotropic receptors (IRs), 4 for sensory neuron membrane proteins (SNMPs), 8 for odorant-binding proteins (OBPs) and 11 for chemosensory proteins (CSPs). The analysis of amino acid sequence indicated that RpedOBP1 and RpedOBP2 have three additional conserved cysteine residues immediately after the sixth cysteine and belong to the plus-C OBP family. 【Conclusion】This study acquired the antennal transcriptom data of *R. pedestris* and

基金项目：国家自然科学基金项目(31601889)；河南省科技计划项目(172102110020)；河南科技大学博士启动基金(13480047)

作者简介：宋月芹，女，1977 年 12 月生，河南孟州人，博士，讲师，研究方向为农业昆虫与害虫防治，E-mail：songyueqin6@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: huizhong66@163.com

收稿日期 Received: 2017-07-22；接受日期 Accepted: 2017-08-27

identified olfaction-related genes. The results provide the important information data of molecular biology for the control of *R. pedestris* using olfaction-related gene targets.

Key words: *Riptortus pedestris*; antennal transcriptome; high-throughput sequencing; gene annotation; chemoreception-related genes

化学感受系统在昆虫的整个生命周期中起着至关重要的作用,包括取食、定位、躲避天敌、交配、寻找适合的寄主、产卵位置的选择等等(Birkett *et al.*, 2004; Kurtovic *et al.*, 2007; Becher *et al.*, 2012),而触角是这一化学感受系统中的主要嗅觉器官,它通过复杂的生物化学反应来确保化学信号的精确传导(Vogt *et al.*, 1985; Ozaki *et al.*, 2005; Vosshall and Stocker, 2007; Benton *et al.*, 2009)。触角外周嗅觉系统中参与化学传导过程的蛋白质主要有气味结合蛋白(odorant-binding proteins, OBPs)(Vogt and Riddiford, 1981)、化学感受蛋白(chemosensory proteins, CSPs)(Pelosi *et al.*, 2014)、嗅觉受体(olfactory receptors, ORs)(Clyne *et al.*, 1999)、味觉受体(gustatory receptors, GRs)(Clyne *et al.*, 2000)、离子型受体(ionotropic receptors, IRs)(Benton *et al.*, 2009)和嗅觉神经元膜蛋白(sensory neuron membrane proteins, SNMPs)(Benton *et al.*, 2007)等,这些蛋白都可能成为未来无公害害虫防治的潜在靶标(Plettner, 2002)。

OBPs 和 CSPs 都是小分子量的可溶性蛋白质,能结合外界环境中的气味,然后通过感器中的淋巴液将气味分子传递到嗅觉神经原的膜表面,完成嗅觉传导的第一步(Vogt *et al.*, 1985)。OBPs 根据序列中半胱氨酸的数量,分为 3 类:1)典型 OBPs,具有 6 个保守的半胱胺酸位点(Sun *et al.*, 2016); 2)Minus-C OBPs,半胱氨酸数量少于 6 个(Gong *et al.*, 2009);3)Plus-C OBPs,具有 6 个以上的保守半胱氨酸位点(Gu *et al.*, 2011)。CSPs 最早被发现在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的触角中,随后在其他目昆虫中陆续鉴定出它的同源基因。CSPs 最先被命名为嗅觉特有蛋白 D(olfactory specific protein D, OS-D)(Mckenna *et al.*, 1994)或 A10(Pikielny *et al.*, 1994),最后统一命名为化学感受蛋白 CSP。CSPs 分子量比 OBPs 小,一般在 10~15 kD 之间,有 4 个保守的半胱胺酸残基位点。在不同目之间,CSPs 氨基酸序列相似度较高。CSPs 基因在昆虫体内普遍表达,不仅在触角、喙、下唇须和下颚须等嗅觉器官中表达(Sun *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016),在足、翅和性腺等非嗅觉器官中也表达(Jacquin-Joly *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2016)。由于 CSPs 基因表达的广泛性,目前对它们的功能还未完全弄清。

点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 属半翅目(Hemiptera)蛛缘蝽科(Alydidae),别名为白条蜂缘蝽和豆缘蝽象,主要分布在东南亚(Tomokuni *et al.*, 1993; Kikuhara, 2005),在我国河南、河北、陕西、安徽、浙江、江西、广西、四川、贵州、云南等省区都有分布。该虫寄主植物主要包括蚕豆、豌豆、菜豆、绿豆、大豆、豇豆、昆明鸡血藤、毛蔓豆等豆科植物(Schaefer and Panizzi, 2000),也为害水稻、小麦、高粱、玉米、红薯、棉花、甘蔗、丝瓜等其他科植物。其为害严重时造成豆类作物空荚或瘪粒(Ha *et al.*, 1998; Son *et al.*, 2000)。由于该虫是新发现害虫,研究较少,再加上农民对该虫认识不足,不能及时防治,造成豆类作物严重减产,品质下降,严重地影响了农民的经济收入。但目前对点蜂缘蝽研究很少,特别是分子生物学信息方面知之甚少。

本研究使用 Illumina HiSeq™ 4000 高通量测序技术对点蜂缘蝽成虫触角进行转录组测序,对 unigene 进行生物学信息分析,挖掘参与点蜂缘蝽嗅觉传递过程中的重要基因信息,并对气味结合蛋白和化学感受蛋白序列进行了比对和同源基因进化树分析,为今后利用基因靶标防治害虫提供更多的参考和借鉴。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

点蜂缘蝽成虫采集于河南省洛阳市李楼村大豆田,在温室内用大豆苗饲养 2 代以上。挑取羽化 3 d 未交配的雌雄成虫为试验用虫,分别将雌雄成虫触角剪下并立即放入液氮中保存,雌雄成虫触角各 200 对用于转录组测序。

1.2　总 RNA 的提取与检测

首先使用 RNAiso™ Plus 试剂盒提取点蜂缘蝽雌雄成虫触角总 RNA,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的降解度和污染;使用 Nanodrop (IMPLEN, CA, USA)通过 OD_{260}/OD_{280} 比值,检测总

RNA 的纯度；利用 Qubit（Life Technologies，CA，USA）对总 RNA 浓度进行测定；使用 Agilent 2100（Agilent Technologies，CA，USA）检测总 RNA 的完整性。

1.3 cDNA 文库构建与测序

将检测合格的点蜂缘蝽雌雄成虫触角总 RNA 按1∶1 的体积混合，然后取 1.5 μg RNA 备用。文库构建使用 NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit（NEB，USA）试剂盒进行，所有操作完全参照试剂盒的说明。具体方法是：首先用带有 Oligo（dT）的磁珠富集 mRNA，然后在 NEBNext（5×）的缓冲液中将 mRNA 打断成短片段。随后使用六碱基随机引物和 M-MuLV 反转录酶合成 cDNA 第 1 链。再加入 DNA Polymerase I 和 RNase H 合成 cDNA 第 2 链，并用 AMPure XP 系统（Beckman Coulter，Beverly，USA）对 cDNA 进行纯化。然后修复末端、加 A 尾和连接测序接头。再用 AMPure XP 系统筛选 150～200 bp 的片段后 PCR 扩增，最后使用 AMPure XP 系统纯化 PCR 产物。在 Agilent Bioanalyzer 2100 系统上对文库质量进行评估。

文库检测合格后，用 Illumina HiSeq™ 4000 测序平台进行测序。cDNA 文库的构建和测序由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

1.4 转录本的拼接与组装

通过测序获得 raw read，再经过去接头、去除 ploy-N 的读数和低质量的读数，获得 clean reads。同时计算 Q20，Q30 和 GC 含量及重复序列水平。采用 Trinity 对 clean reads 进行拼接组装获得转录本序列，取每条基因中最长的转录本作为 Unigene，进行后续分析。

1.5 Unigene 的功能注释

功能基因的注释使用下列 7 个数据库及参数标准：NR 蛋白数据库（NCBI non-redundant protein sequences，NCBI blast 2.2.28+，e-value = 1e-5）；NT 核酸数据库（NCBI non-redundant nucleotide sequences，NCBI blast 2.2.28+，e-value = 1e-5）；Pfam 蛋白家族（Protein family，HMMER 3.0 package，e-value = 0.01）；KOG/COG 直系同源基因簇（clusters of orthologous groups of proteins，NCBI blast 2.2.28+，e-value = 1e-3）；Swiss-Prot 数据库（A manually annotated and reviewed protein sequence database，NCBI blast 2.2.28+，e-value = 1e-5）；KO 京都基因与基因组百科全书（KEGG Ortholog database，e-value = 1e-10）；GO 基因本体论（Gene Ontology，Blast2GO v2.5，e-value = 1e-6）。

1.6 化学感受相关基因的分析

利用在线工具 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast）对同源基因进行搜索；使用 Expasy（http://web.expasy.org/protparam/）和 SignalP（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）在线网址对氨基酸序列等电点、分子量和信号肽进行分析；用 DNAMAN 6.0 软件进行序列对比；运用 ClustalX 2.1（Larkin *et al*.，2007）软件对氨基酸序列进行比对，然后使用 Seaview v.4. 软件，PhyML 进化树中的 JTT 模式构建进化树。使用 Fig Tree v.1.3.1 软件对进化树进行编辑。

2 结果

2.1 点蜂缘蝽触角转录组的测序和组装

对点蜂缘蝽触角转录组进行 Illumina 测序，结果共获得 46 972 930 条 raw read，测序数据经过滤后获得 45 802 812 条 clean read，包含 6.87 Gb（GenBank 登录号：SRR4429103），Q20（表示质量值≥20 的碱基所占百分比）为 94.48%，GC 含量为 40.08%（表 1），这些数据表明测序结果良好，可信度高。

表 1 点蜂缘蝽触角转录组数据统计表

Table 1 Summary of *Riptortus pedestris* antennal transcriptome data

原始总读数 Total raw reads	筛选后总读数 Total clean reads	筛选后总核酸数(Gb) Total clean nucleotides	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
46 972 930	45 802 812	6.87	94.48	86.99	40.08

Q20，Q30：分别表示质量值≥20 和 30 的碱基所占百分比 Percentages of bases with the quality value≥20 and 30，respectively.

将 clean read 数据采用 Trinity 软件进行拼接，获得 115 935 条转录本，平均长度为 777 bp，N50 为 1 505 bp。取每条基因中最长的转录本作为 unigene，共获得 92 259 条 unigenes，平均长度为 618 bp，N50 为 1 013 bp。随着序列长度的增加，unigene 数量逐渐减少。大于 500 bp 的 unigenes 有 27 186 条，占整

个 unigenes 的 29.47%。

2.2　Unigenes 的功能注释

将获得的 unigenes 在七大数据库中进行功能注释,结果显示,在所有数据库注释成功的基因有 2 608条(2.82%),至少在一个数据库里注释成功的有 21 365 条(23.15%),但有 70 894 条(76.84%)基因未注释。其中在 NR 数据库中注释的基因最多,为 16 247 条(17.61%)。

将 unigenes 在 NR 数据库比对发现,点蜂缘蝽基因序列与内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* 相似度最高,为 15.22%,与先前报道的点蜂缘蝽序列相似度为 7.9%,与豌豆长管蚜 *Acyrthosiphon pisum* 相似度为 5.6%,与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 相似度为 5.2%,柑橘木虱 *Diaphorina citri* 相似度为 4.2%。在 NR 数据库序列比对 e-value 值为 0 的 unigenes,占总数的 15.9%;e-value 值为 0 ~ 1e − 45 的 unigenes,占总数的 34.9%;e-value 值为 1e − 45 ~ 1e − 5 的 unigenes,占总数的 49.1%。将点蜂缘蝽 unigenes 在 NR 数据库序列比对,相似度在 18% ~ 40%之间的 unigenes 总数最少,为 0.2%;相似度在 60% ~80%之间的占 unigenes 总数最多,为 48.3%。

2.3　Unigenes 的功能分类

Unigene 经过 GO 注释后,发现 23 788 条 unigenes 注释为细胞组分(cellular component)、17 872条为分子功能(molecular function)和 38 525 条为生物学过程(biological process)。其中基因富集较多的 GO terms 分别是细胞进程(cellular process, 8 464 条)、结合(binding, 8 435 条)、代谢过程(metabolic process, 7 474 条)、单有机体过程(single-organism process, 6 508 条)、催化活动(catalytic activity, 6 083 条)、细胞整体(cell, 4 670 条)和细胞部分(cell part, 4 670 条),其他 GO team 都小于 4 000 条。

有 7 137 条 unigenes 进入 KO 数据库注释,将它们分为五类功能,可能参与了 32 个已知的 KEGG 代谢通路,其中基因富集最多的通路是信号传导(signal transduction, 828 条),其次是翻译(translation, 725 条),再其次是碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism, 567 条)和氨基酸代谢(amino acid metabolism, 515 条),其他代谢通路 unigenes 数小于 500 条。

2.4　化学感受相关基因鉴定

所有 unigenes 经过七大数据库比对注释和搜索后,鉴定出 219 个化学感受相关基因,其中 188 个嗅觉受体、6 个味觉受体、2 个离子型受体、4 个感觉神经元膜蛋白、8 个气味结合蛋白和 11 个化学感受蛋白基因。

获得的 8 个气味结合蛋白中有 2 个基因未得到全长,其中 1 个基因长度小于 200 bp,未在 NCBI 数据库注册,其他 7 个基因依次被命名为 *RpedOBP*1 − 7,GenBank 登录号为 MF627734 − MF627740。11 个化学感受蛋白中有 2 个基因未得到全长,其中 1 个基因序列小于 200 bp,未在 NCBI 数据库注册,其他 10 个基因依次命名为 *RpedCSP*1 − 10,GenBank 登录号为 MF614836 − MF614845。

点蜂缘蝽 CSPs 同源基因序列相似度普遍较 OBPs 高, RpedCSP2 与黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis* 同源基因序列相似度最高,为 81%,其余 CSPs 基因学列相似度也在 42%之上,而点蜂缘蝽 OBPs 与同源基因序列相似度最高才达到 42%(RpedOBP7)。点蜂缘蝽 OBPs 蛋白序列在 142 ~ 223 aa 之间,分子量在 15 kD 以上,而 CSPs 蛋白序列在 125 ~133 aa 之间,分子量大约 14 ~15 kD。点蜂缘蝽 OBPs 和 CSPs 在成熟氨基酸序列 N 端均具有信号肽(表 2)。

基因序列对比发现,点蜂缘蝽 OBPs 分两种类型,一种是带有 6 个半胱氨酸保守位点的典型 OBPs (RpedOBP4 − 7)(图 1),另一种是除 6 个保守的半胱氨酸位点外,在第 6 个半胱氨酸后面又多加了 3 个半胱氨酸,称为 Plus-C OBPs(RpedOBP1 − 2)(图 2)。进一步通过进化树分析,同样将点蜂缘蝽分为典型 OBPs 和 Plus-C OBPs 两个分枝(图 3)。

序列分析发现,点蜂缘蝽 CSPs 都具有 4 个保守的半胱氨酸位点(图 4)。去掉 1 个序列较短的 CSP,剩余 10 个 CSPs 与半翅目和鳞翅目其他昆虫 CSPs 同源基因序列构建进化树,结果发现, CSPs 分

```
RpedOBP4  MAHRSNSHIILIYIALIAIHQLRAQEPK.GTQFKKRFLRYSSHCAQQHSTTLVDIMGLLAGEETSSS.SGKCYILCMLAQYKIINRDGGYRRETFKEFLN.SMPESRFKKSLEASSQDCYKQDNQE...ECEKAYRFARCFYTSAISSKKYP.......
RpedOBP5  ......FLQVALFLALATLAAARPEGPDARKQFLRAEKAILEKCSKETKAPKGFVDDIFVREVVPSSKEGKCFTKCALQNLKWMKSDGSLDAVAIAKLADKAYFNKEQNAKAAGIWKKCYAEQPKTGNDHCELAYKALNCYFTGAKAAGLPRHSQG...
RpedOBP6  .........MAYFTILLIGALASSVCSEPEEDIRKLETEILDVCKEKTKASQDAVNQLLKSGDLDESPEGKCLIKCGLQTFGTMTEDGAFNNIRARDYMKGAYP..ENVDEAAEIWENCQAHAKKT.DDKCDYAYKVIKCFFAGIKNQNIKKAW.....
RpedOBP7  .....MAFLLQLSVLIAALHYIAAGPVDEAKQMLQTELLTYEKCGKENNIAEAELERIISHYEIADTRNAKCLASCHLRGMKMMSEDGVVNWDRVDEIHQIEYVKPEDDAKALEVTKACRNSVKGT.ADHCDTAYLALKCFLDNAKKANLHLLGTEDLQ
consensus c kc c l dg c c ay c
          * * * * * *
```

图 1　点蜂缘蝽 4 个典型气味结合蛋白的序列比对

Fig. 1　Sequence alignment of four classic OBPs of *Riptortus pedestris*

星号表示 6 个保守的半胱氨酸残基。Asterisks indicate six conserved cysteine residues.

表 2 点蜂缘蝽化学感受相关基因序列信息

Table 2 Sequence information of chemoreception-related genes of *Riptortus pedestris*

基因 Genes	GenBank 登录号 GenBank accession no.	开放阅读框 ORF (aa)	分子量(kD) Molecular weight	等电点 Isoelectric point	信号肽 Signal peptide	全长 Full length	同源性搜索 Homology search with the known proteins					
							基因注释 Gene annotation	物种 Species	蛋白登录号 Protein ID	得分(bits) Score	拟合系数 E-value	一致性(%) Identity
*RpedOBP*1	MF627734	223	24.80	5.93	1-22	yes	OBP31	美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*	AHF71062.1	103	5e-24	31
*RpedOBP*2	MF627735	215	23.94	4.49	1-33	yes	OBP31	绿盲蝽 *Apolygus lucorum*	AMQ76484.1	97.8	9e-22	32
*RpedOBP*3	MF627736	80	-	-	-	no	OBP2	蝽 *Chinavia ubica*	AIU64825.1	57.4	2e-08	36
*RpedOBP*4	MF627737	146	16.90	9.25	1-24	yes	OBP28	绿盲蝽 *Apolygus lucorum*	AMQ76481.1	108	2e-27	36
*RpedOBP*5	MF627738	155	16.43	9.30	1-16	no	OBP6	中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*	AHJ81241.1	67.4	2e-11	28
*RpedOBP*6	MF627739	142	15.90	4.99	1-18	yes	OBP12	东亚飞蝗 *Locusta migratoria*	AEX33168.1	55.5	8e-07	31
*RpedOBP*7	MF627740	153	17.12	5.2	1-19	yes	OBP4	蝽 *Chinavia ubica*	AIU64827.1	126	3e-34	42
*RpedCSP*1	MF614836	127	14.39	8.18	1-19	yes	CSP1	葱地种蝇 *Delia antiqua*	BAI82449.1	149	6e-44	55
*RpedCSP*2	MF614837	125	14.17	8.95	1-17	yes	CSP3	黑肩绿盲蝽 *Cyrtorhinus lividipennis*	ARJ35778.1	206	1e-66	81
*RpedCSP*3	MF614838	133	15.09	5.79	1-18	yes	CSP8	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	ACJ64054.1	144	4e-42	55
*RpedCSP*4	MF614839	121	13.88	5.12	1-16	no	CSP6	苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*	ACZ58024.1	145	2e-42	57
*RpedCSP*5	MF614840	133	15.05	5.16	1-20	yes	CSP4	苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*	ACZ58022.1	131	7e-37	46
*RpedCSP*6	MF614841	130	15.19	9.26	1-19	yes	CSP9	褐飞虱 *Nilaparvata lugens*	ACJ64055.1	115	8e-30	42
*RpedCSP*7	MF614842	126	14.51	5.67	1-16	yes	CSP3	绿盲蝽 *Apolygus lucorum*	AEP95757.1	165	2e-50	59
*RpedCSP*8	MF614843	130	14.54	9.06	1-16	yes	CSP8	烟粉虱 *Bemisia tabaci*	AQS80468.1	163	1e-49	63
*RpedCSP*9	MF614844	132	14.74	9.13	1-16	yes	CSP8	烟粉虱 *Bemisia tabaci*	AQS80468.1	171	7e-53	69
*RpedCSP*10	MF614845	131	15.08	4.78	1-19	yes	CSP4	苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*	ACZ58022.1	140	1e-40	50

-：基因序列太短，分子量、等电点和信号肽未计算 The sequence of gene was too short, and the molecular weight, isoelectric point and signal peptide were not calculated.

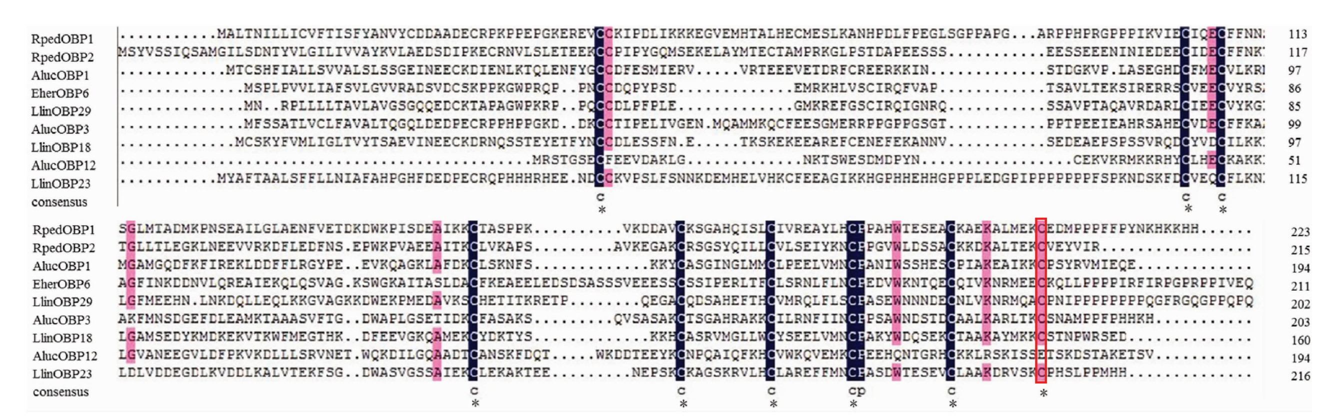


图 2 点蜂缘蝽 OBPs（RpedOBP1 与 RpedOBP2）与其他昆虫 Plus-C OBPs 的序列比对

Fig. 2 Alignment of Plus-C OBPs of *Riptortus pedestris* (RpedOBP1 and RpedOBP2) and other insect species

其他昆虫 Plus-C 气味结合蛋白来源及 GenBank 登录号 Source of plus-C OBPs of other insects and their GenBank accession numbers：AlucOBP1，AlucOBP3，AlucOBP12：绿盲蝽 *Apolygus lucorum*，ADD84665.1，AEP95760.1，AFJ54053.1；EherOBP6：美洲蝽 *Euschistus heros*，AIU64823.1；LinOBP18，LlinOBP23，LlinOBP29：美国牧草盲蝽 *Lygus lineolaris*，AHF71046.1，AHF71053.1，AHF71060.1. 星号表示保守的半胱氨酸残基。Asterisks indicate the conserved cysteine residues.

图 3 点蜂缘蝽与其他昆虫气味结合蛋白的进化树

Fig. 3 Phylogenetic relationship of odorant binding proteins (OBPs) of *Riptortus pedestris* and other insects

气味结合蛋白来源 Source of OBPs：点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris*（RpedOBP），绿盲蝽 *Apolygus lucorum*（AlucOBP），苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus*（AlinOBP），中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis*（AsutOBP），草履蚧 *Drosicha Corpulenta*（DcorOBP），烟粉虱 *Bemisia tabaci*（BtabOBP），灰飞虱 *Laodelphax striatella*（LstrOBP），白背飞虱 *Sogatella furcifera*（SfurOBP），棉蚜 *Aphis gossypii*（AgosOBP），大豆蚜 *Aphis glycines*（AglyOBP），家蚕 *Bombyx mori*（BmorOBP），棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（HarmOBP）. 进化树中序列名为 GenBank 登录号 + 基因名；蓝色区域为 plus-C 气味结合蛋白。The names of sequences are GenBank accession no. plus gene name in the phylogenetic tree. The region of blue color is plus-C OBPs.

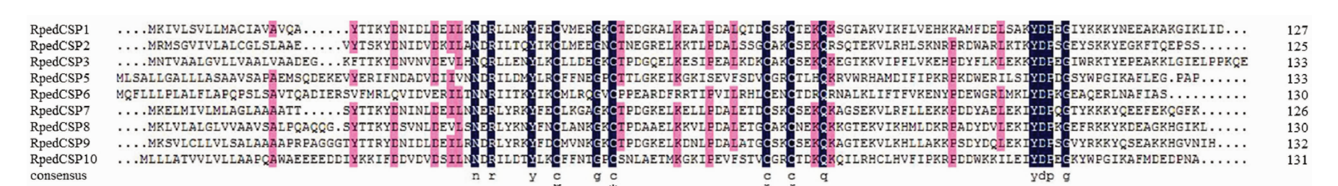


图 4　点蜂缘蝽 9 个化学感受蛋白的序列比对

Fig. 4　Sequence alignment of nine chemosensory proteins (CSPs) of *Riptortus pedestris*

星号表示 4 个保守的半胱氨酸残基。Asterisks indicate four conserved cysteine residues.

为两大枝,点蜂缘蝽主要集中在其中一个分枝上,相当分散,但每一个点蜂缘蝽 CSP 序列都插在与其对应的同源性较高的分枝中,而鳞翅目 CSPs 具有两个特有的分区(图 5)。

图 5　点蜂缘蝽与其他昆虫化学感受蛋白的进化树

Fig. 5　Phylogenetic relationship of chemosensory proteins (CSPs) of *Riptortus pedestris* and other insects

化学感受蛋白来源 Source of CSPs: 点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* (RpedCSP), 绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (AlucCSP), 苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* (AlinCSP), 中黑盲蝽 *Adelphocoris suturalis* (AsutCSP), 豆荚盲蝽 *Lygus Hesperus* (LhesCSP), 刺蝽象 *Triatoma brasiliensis* (TbraCSP), 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (BtabCSP), 灰飞虱 *Laodelphax striatella* (LstrCSP), 褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (NlugCSP), 白背飞虱 *Sogatella furcifera* (SfurCSP), 棉蚜 *Aphis gossypii* (AgosCSP), 扶桑绵粉蚧 *Phenacoccus solenopsis* (PsolCSP), 家蚕 *Bombyx mori* (BmorCSP), 棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (HarmCSP). 进化树中序列名为 GenBank 登录号 + 基因名。The names of sequences in the phylogenetic tree are GenBank accession no. plus gene name.

3 讨论

随着新一代高通量测序技术的发展，通过转录组测序逐渐成为挖掘非模式生物功能基因的有效捷径（张棋麟和袁明龙，2013）。本研究利用 Illumina HiSeq™ 4000 高通量测序技术，对点蜂缘蝽雌雄成虫触角转录组进行测序，获得 92 259 条 unigenes，平均长度为 618 bp，N50 为 1 013 bp，这与大多数昆虫触角转录组获得的结果一致（An *et al.*，2016；Xiao *et al.*，2016；Zhang *et al.*，2016）。对所有的 unigenes 进行功能注释和同源搜索发现，有 21 365（23.15%）条 unigenes 注释成功，还有 70 894（76.84%）条 unigenes 未注释到，这可能与 unigenes 的片段长度有关，因为有 46.53% 的 unigenes 的长度在 300 bp 以下。也有可能部分 unigenes 为非编码基因或注释基因还不够丰富。在 NR 蛋白数据库中注释到 unigenes 数最多，为 16 247 条，占总 unigenes 基因数的 17.61%，这与大多数研究结果相同（金永玲，2015；孟翔等，2016），说明 NR 数据库储存基因数量大、种类多。其中点蜂缘蝽触角转录组序列与内华达古白蚁基因序列相似度最高，为 15.22%，与赤拟谷盗基因序列相似度为 5.2%，而与点蜂缘蝽同一目的豌豆长管蚜和柑橘木虱基因序列相似度仅为 5.6% 和 4.2%，这可能是由于半翅目基因数据在 NR 数据库中还不够丰富（An *et al.*，2016）。

本研究发现的 23 788 条 unigenes 经 GO 注释分为三大功能，其中在分子功能中，结合（binding，8 435）和催化活动（catalytic activity，6 083）所占基因数最多，这些基因的表达模式符合触角的功能。在 KO 数据库中，共注释到 7 137 条 unigenes，并对这些基因进行了 KEGG 代谢通路分析，将它们分为五类功能，主要参与了 32 个 KEGG 代谢通路，其中信号传导（signal transduction，828）是最大的代谢通路，这与触角是气味结合和信号传导的主要器官密切相关。另外，我们也鉴定到与外源性物质降解和代谢（xenobiotics biodegradation and metabolism，147）有关的基因，这些基因可能牵扯到触角嗅觉信号传递过程中对气味的降解功能（Leal，2013）。

触角是昆虫接受外界信息、传递信号，使昆虫做出相应反应的主要器官。我们通过 Blast 和同源搜索，鉴定出 219 个与嗅觉相关的基因，包括 188 个嗅觉受体、6 个味觉受体、2 个离子型受体、4 个感觉神经元膜蛋白、8 个气味结合蛋白和 11 个化学感受蛋白。在其他半翅目昆虫触角转录组中，也鉴定出不同类型和数量的嗅觉基因。如在苜蓿盲蝽 *Adelphocoris lineolatus* 触角转录组中，鉴定出 80 个嗅觉受体、12 个离子型受体、4 个味觉受体、14 个气味结合蛋白和 4 个感觉神经元膜蛋白（Gu *et al.*，2011；Xiao *et al.*，2016）；在绿盲蝽 *Apolygus lucorum* 触角转录组中，鉴定出 110 个嗅觉受体（An *et al.*，2016）、38 个气味结合蛋白（Yuan *et al.*，2015）；在小长蝽 *Nysius ericae* 触角转录组中，鉴定出 83 个嗅觉受体、12 个离子型受体、7 个味觉受体、28 个气味结合蛋白、16 个化学感受蛋白、2 个感觉神经元膜蛋白（Zhang *et al.*，2016）。与半翅目其他昆虫触角转录组中鉴定出的嗅觉相关基因数量相比，除离子型受体和气味结合蛋白基因数量较少外，其他基因都在合理的范围之内。

点蜂缘蝽 OBPs 基因分两种类型，*RpedOBP*4－7 都为典型 OBPs，序列完全符合 $C1\text{-}X_{15\text{-}39}\text{-}C2\text{-}X_3\text{-}C3\text{-}X_{21\text{-}44}\text{-}C4\text{-}X_{7\text{-}12}\text{-}C5\text{-}X_8\text{-}C6$ 结构模式（Sun *et al.*，2016）；*RpedOBP*1－2 为 Plus-C OBPs 基因，结构模式基本上符合 $C1\text{-}X_{33\text{-}64}\text{-}C2\text{-}X_3\text{-}C3\text{-}X_{40\text{-}43}\text{-}C4\text{-}X_{9\text{-}22}\text{-}C5\text{-}X_9\text{-}C6\text{-}X_8\text{-}C7\text{-}X_{10}\text{-}C8\text{-}X_9\text{-}C9$。对来自于半翅目和鳞翅目的 158 个 OBPs 同源基因进行进化树比较，同样将 OBPs 划分为典型 OBPs 和 Plus-C OBPs 两个分枝，但目前关于典型 OBPs 和 Plus-C OBPs 之间的功能差异还不清楚。点蜂缘蝽 CSPs 氨基酸序列都具有 4 个保守的半胱氨酸位点，并且符合 CSPs 基因的结构模式 $C1\text{-}X_6\text{-}C2\text{-}X_{18}\text{-}C3\text{-}X_2\text{-}C4$（Sun *et al.*，2016）。与其他昆虫进化树分析发现，点蜂缘蝽化学感受蛋白分布相当分散，说明 CSPs 基因分化较大，但是每一个化学感受蛋白序列都能插在与其对应的同源性较高的分枝中。不同目昆虫之间化学感受蛋白有自己特有的分区，这可能是长期对环境适应的结果。因此，通过对点蜂缘蝽触角转录组数据的分析，挖掘出更多与嗅觉相关的基因，了解这些基因的特性，为今后利用嗅觉靶标防治点蜂缘蝽提供更多理论参考。

参考文献（References）

An XK, Sun L, Liu HW, Liu DF, Ding YX, Li LM, Zhang YJ, Guo YY, 2016. Identification and expression analysis of an olfactory receptor gene family in green plant bug *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Sci. Rep.*, 6: 37870.

Becher PG, Flick G, Rozpedowska E, Schmidt A, Hagman A, Lebreton S, Larsson MC, Hansson BS, Piškur J, Witzgall P, Bengtsson M, 2012. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster*

attraction, oviposition and development. *Funct. Ecol.*, 26(4): 822-828.

Benton R, Vannice KS, Gomez-Diaz C, Vosshall LB, 2009. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila*. *Cell*, 136: 149-162.

Benton R, Vannice KS, Vosshall LB, 2007. An essential role for a CD36-related receptor in pheromone detection in *Drosophila*. *Nature*, 450: 289-293.

Birkett MA, Agelopoulos N, Jensen KMV, Jespersen JB, Pickett JA, Prijs HJ, Thomas G, Trapman JJ, Wadhams LJ, Woodcock CM, 2004. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. *Med. Vet. Entomol.*, 18(4): 313-322.

Clyne PJ, Warr CG, Carlson JR, 2000. Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science*, 287: 1830-1834.

Clyne PJ, Warr CG, Freeman MR, Lessing D, Kim J, Carlson JR, 1999. A novel family of divergent seven transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*. *Neuron*, 22: 327-338.

Gong DP, Zhang HJ, Zhao P, Xia QY, Xiang ZH, 2009. The odorant binding protein gene family from the genome of silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 10: 332.

Gu SH, Wang SP, Zhang XY, Wu KM, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ, 2011. Identification and tissue distribution of odorant binding protein genes in the lucerne plant bug *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(4): 254-263.

Ha KS, Heo NK, Kim JR, Kim SY, Song SH, 1998. Effect of different seeding times and soybean varieties on damage and occurrences of hemiptera insects. *RDA J. Crop Prot.*, 40: 32-36.

Jacquin-Joly E, Vogt RG, François MC, Nagnan-Le Meillour P, 2001. Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses*, 26: 833-844.

Jin YL, Cong B, Wang LY, Zhang HY, Dong H, 2015. An analysis of the transcriptome of *Epacromius coerulipes* (Orthoptera: Acrididae). *Acta Entomol. Sin.*, 58(8): 817-825. [金永玲, 丛斌, 王丽艳, 张海燕, 董辉, 2015. 大垫尖翅蝗转录组分析. 昆虫学报, 58(8): 817-825]

Kikuhara Y, 2005. The Japanese species of the genus *Riptortus* (Heteroptera, Alydidae) with description of a new species. *Jpn. J. Syst. Entomol.*, 11: 299-311.

Kurtovic A, Widmer A, Dickson B, 2007. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature*, 466(7153): 542-546.

Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.

Leal WS, 2013. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. *Annu. Rev. Entomol.*, 58: 373-391.

McKenna MP, Hekmat-Scafe DS, Gaines P, Carlson JR, 1994. Putative *Drosophila* pheromone-binding proteins expressed in a subregion of the olfactory system. *J. Biol. Chem.*, 269: 16340-16347.

Meng X, Hu JJ, Liu H, Ouyang GC, Guo MF, 2016. Analysis of the transcriptome and olfaction-related genes of *Conopomorpha sinensis* Bradley (Lepidoptera: Gracilariidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(8): 823-830. [孟翔, 胡俊杰, 刘慧, 欧阳革成, 郭明昉, 2016. 荔枝蒂蛀虫转录组及嗅觉相关基因分析. 昆虫学报, 59(8): 823-830]

Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R, 2005. Ant nestmate and non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science*, 309: 311-314.

Pelosi P, Iovinella I, Felicioli A, Dani FR, 2014. Soluble proteins of chemical communication: an overview across arthropods. *Front. Physiol.*, 5: 320.

Pikielny C, Hasan G, Rouyer F, Rosbash M, 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12: 35-49.

Plettner E, 2002. Insect pheromone olfaction: new targets for the design of species-selective pest control agents. *Curr. Med. Chem.*, 9(10): 1075-1085.

Schaefer CW, Panizzi AR, 2000. Heteroptera of Economic Importance. CRC Press, Florida. 856 pp.

Son CK, Hwang SG, Hyun Y, Choi BS, 2000. Field occurrence of stink bug and its damage in soybean. *Korean J. Crop Sci.*, 45: 405-410.

Sun HZ, Song YQ, Du J, Wang XD, Cheng ZJ, 2016. Identification and tissue distribution of chemosensory protein and odorant binding protein genes in *Athetis dissimilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.*, 51(3): 409-420.

Tomokuni M, Yasunaga T, Takai M, Yamashita I, Kawamura M, Kawasawa T, 1993. A Field Guide to Japanese Bugs: Terrestrial Heteropterans. Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai, Tokyo. 380 pp.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161-163.

Vogt RG, Riddiford LM, Prestwich GD, 1985. Kinetic properties of a sex pheromone-degrading enzyme: the sensillar esterase of *Antheraea polyphemus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8827-8831.

Vosshall LB, Stocker RF, 2007. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30: 505-533.

Xiao Y, Sun L, Ma XY, Dong K, Liu HW, Wang Q, Guo YY, Liu ZW, Zhang YJ, 2016. Identification and characterization of the distinct expression profiles of candidate chemosensory membrane proteins in the antennal transcriptome of *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Mol. Biol.*, 26(1): 74-91.

Yuan HB, Ding YX, Gu SH, Sun L, Zhu XQ, Liu HW, Dhiloo KH, Zhang YJ, Guo YY, 2015, Molecular characterization and expression profiling of odorant-binding proteins in *Apolygus lucorum*. *PLoS ONE*, 10(10): e0140562.

Zhang QL, Yuan ML, 2013. Progress in insect transcriptomics based on the next-generation sequencing technique. *Acta Entomol. Sin.*, 56(12): 1489-1508. [张棋麟, 袁明龙, 2013. 基于新一代测序技术的昆虫转录组学研究进展. 昆虫学报, 56(12): 1489-1508]

Zhang YN, Zhu XY, Zhang Q, Yin CY, Dong ZP, Zuo LH, Deng DG, Sun L, Li XM, 2016. *De novo* assembly and characterization of antennal transcriptome reveal chemosensory system in *Nysius ericae*. *J. Asia-Pac. Entomol.*, 19: 1077-1087.

Zhou SH, Zhang J, Zhang SG, Zhang L, 2008. Expression of chemosensory proteins in hairs on wings of *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *J. Appl. Entomol.*, 132: 439-450.

(责任编辑: 马丽萍)